



REC D 0 6 AUG 1998
WIPO PCT

Bescheinigung

PRIORITY DOCUMENT

Die Progen Biotechnik GmbH in Heidelberg/Deutschland hat
eine Patentanmeldung unter der Bezeichnung

"Tissue-Faktor zur Förderung von Wundheilung"

am 9. Mai 1997 beim Deutschen Patentamt eingereicht.

Die Anmeldung ist auf die Merckle GmbH in Blaubeuren/
Deutschland umgeschrieben worden.

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wieder-
gabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

Die Anmeldung hat im Deutschen Patentamt vorläufig das Symbol
A 61 K 38/14 der Internationalen Patentklassifikation erhalten.

München, den 13. Juli 1998

Der Präsident des Deutschen Patentamts

Im Auftrag

Agurks

Patentzeichen: 197 19 652.7

Anmelder: Progen Biotechnik GmbH
Unser Zeichen: P 3003 - hu / msl

Tissue-Faktor zur Förderung von Wundheilung

Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung von Tissue-Faktor zur Förderung von Wundheilung.

5 Wundheilung ist bei vielen Erkrankungen, wie Diabetes mellitus, Vaskulitis, arterieller Verschußkrankheit, chronischem venösen und infiziertem Ulcus, gestört. Auch gibt es große Probleme mit Wundheilung bei Innervationsstörungen, wie Paraplegie, Lepra, Neuropathie, etc., und Dekubitus von Pflegebedürftigen. Ferner sind Nahtschwächen und Wundheilungsstörungen bei Operationen, insbesondere des Darmes bzw. Transplantationen von Haut oder anderen Organen, bekannt. Bisher gibt es keine zufriedenstellenden Mittel, um bei Störungen vorstehender Art eingreifen zu können.

10 Der vorliegenden Erfindung liegt somit die Aufgabe zugrunde, ein Mittel bereitzustellen, mit dem man gestörter Wundheilung entgegentreten kann.

15 Erfindungsgemäß wird dies durch die Gegenstände in den Patentansprüchen erreicht.

20 Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist somit die Verwendung von Tissue-Faktor zur Förderung von Wundheilung.

25 Die vorliegende Erfindung beruht auf der Erkenntnis des Anmelders, daß Tissue-Faktor in Wunden von Tieren zur Bildung von Blutgefäßen und somit zur Wundheilung führt.

Tissue-Faktor ist ein Transmembran-Glykoprotein, das die Blutgerinnungsfaktoren VII bzw. VIIa bindet. Durch diese Bindung wird eine Aktivierung der Blut-

gerinnungsfaktoren X bzw. IX bewirkt, wodurch die Blutgerinnung über den extrinsischen bzw. intrinsischen Weg in Gang gesetzt wird. Tissue-Faktor hat ein Molekulargewicht von 43-46 kD. Seine Primärstruktur ist bekannt, ebenso das Gen für Tissue-Faktor und dessen Lokalisierung auf dem Chromosom (vgl. Scarpati, E.M., et al., Biochemistry 26, (1987), 5234-5238).

Erfindungsgemäß wird Tissue-Faktor zur Förderung von Wundheilung verwendet. Der Ausdruck "Tissue-Faktor" betrifft einen Tissue-Faktor jeglicher Art und Herkunft. Es kann ein tierischer oder menschlicher Tissue-Faktor sein. Auch kann es ein Fragment eines Tissue-Faktors sein, das die Fähigkeit hat, Wundheilung zu fördern. Der Tissue-Faktor kann eine Wildtyp-Sequenz aufweisen. Auch kann seine Sequenz gegenüber der Wildtyp-Sequenz durch eine oder mehrere Aminosäuren verschieden sein. Ferner kann der Tissue-Faktor Teil eines Fusionsproteins sein.

In bevorzugter Ausführungsform liegt der Tissue-Faktor in Form einer exprimierbaren Nukleinsäure vor. Diese kann eine DNA und/oder RNA sein, wobei eine DNA, insbesondere cDNA, bevorzugt ist. Die vorstehenden Ausführungen hinsichtlich des Tissue-Faktor gelten hier entsprechend für die Nukleinsäure.

Die Expression der Nukleinsäure kann in üblicher Weise erreicht werden. Günstig kann es sein, wenn die Nukleinsäure, z.B. als DNA, insbesondere cDNA, in einem Vektor vorliegt, der zur Expression in tierischen Zellen geeignet ist. Solche Expressionsvektoren sind dem Fachmann bekannt. Beispielsweise können es Virus- oder Plasmid-Vektoren sein. Vorteilhaft ist es, wenn die Vektoren nicht in die DNA von Zellen integrieren, sondern episomal in den Zellen verbleiben. Damit wird eine transiente Expression des Tissue-Faktor erreicht, was bevorzugt ist. Ferner kann die Nukleinsäure als DNA, insbesondere cDNA, unter der Kontrolle eines konstitutiven oder induzierbaren Promotors stehen. Ein induzierbarer Promotor kann z.B. Gewebe-, Organ- und/oder Tumor-spezifisch sein.

Günstig kann es sein, wenn die Nukleinsäure als DNA, insbesondere cDNA, unter der Kontrolle des CMV-Promotors z.B. in dem Expressionsvektor pcDNA3

(Invitrogen), oder unter der Kontrolle des SV40 Promotors, z.B. in dem Expressionsvektor pSVK3 (Pharmacia) vorliegt. Solche mit pcDNA3-TF (Tissue-Faktor) bzw. pSVK3-TF bezeichnete Expressionsplasmide sind ebenfalls Gegenstand der vorliegenden Erfindung. Besonders vorteilhaft kann es sein, wenn die Nukleinsäure als DNA, insbesondere cDNA, in einem Sindbis-Virus-Replikon-Vektor vorliegt. Ein solcher Vektor erlaubt eine extrem hohe Expression der Nukleinsäure. Ein Beispiel eines solchen Vektors ist das ELVS-Vektor-System von Viagene Inc.. Ein mit ELVS-TF (Tissue-Faktor) bezeichnetes Expressionsplasmid ist ebenfalls Gegenstand der vorliegenden Erfindung. Zur Herstellung eines vorstehenden Vektors wird der Fachmann auf bekannte Verfahren zurückgreifen. Ergänzend wird auf Maniatis, T., et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1982 verwiesen.

Erfindungsgemäß wird Tissue-Faktor zur Förderung von Wundheilung verwendet. Der Ausdruck "Wundheilung" betrifft eine Wundheilung jeglicher Art und an jeglicher Stelle. Es kann normale und gestörte Wundheilung sein. Letztere findet sich insbesondere bei Erkrankungen, wie Diabetes mellitus, Vaskulitis, arterieller Verschußkrankheit, chronischem venösen und infiziertem Ulcus. Auch findet sich eine gestörte Wundheilung bei Innervationsstörungen, wie Paraplegie, Lepra, Neuropathie, etc., und Dekubitus von Pflegebedürftigen. Des weiteren liegt eine gestörte Wundheilung vor, wenn Nahtschwächen und Heilungsstörungen bei Operationen, insbesondere des Darms und Transplantationen der Haut bzw. anderer Organe, auftreten.

Erfindungsgemäß wird Tissue-Faktor in Form eines Proteins oder einer exprimierbaren Nukleinsäure zur Förderung von Wundheilung verabreicht. Günstig kann es sein, den Tissue-Faktor in Kombination mit weiteren die Wundheilung fördernden Faktoren, wie z.B. "vascular endothelial growth factor" (VEGF), zu verabreichen. Diese Faktoren können ebenfalls in Form von Proteinen und/oder exprimierbaren Nukleinsäuren vorliegen. Die Verabreichung von Tissue-Faktor und den genannten Faktoren kann gleichzeitig oder nacheinander erfolgen. Die Art der Verabreichung von Tissue-Faktor alleine bzw. zusammen mit den ge-

nannten Faktoren kann sich am Wirkungsort, d.h. an der Stelle, wo eine Wundheilung gefördert werden soll, orientieren. Beispielsweise bietet es sich an, eine Stelle auf der Körperoberfläche lokal und eine im Inneren des Körpers systemisch zu behandeln. Zur Verabreichung von Tissue-Faktor alleine bzw. zusammen mit den genannten Faktoren können übliche Verfahren verwendet werden. Für die lokale Verabreichung ist es z.B. günstig, den oder die Faktoren in Liposomen zu verpacken oder auf Goldpartikel zu absorbieren und die Liposomen an der entsprechenden Stelle des Körpers aufzutragen bzw. die Goldpartikel in das Gewebe hineinzuschießen. Ferner werden für die Verabreichung von Tissue-Faktor alleine bzw. zusammen mit den genannten Faktoren pharmazeutische Zusammensetzungen bereitgestellt, die übliche Hilfsstoffe, wie Träger, Lösungsmittel, etc. enthalten. Solche Zusammensetzungen sind ebenfalls Gegenstand der vorliegenden Erfindung.

Mit der vorliegenden Erfindung ist es möglich, Wundheilung zu fördern. Dies hat eine große Bedeutung bei Erkrankungen, wo eine gestörte Wundheilung vorliegt. Beispiele solcher Erkrankungen sind vorstehend angegeben. Von diesen ist ganz besonders Diabetes mellitus zu erwähnen, wo durch die vorliegende Erfindung es möglich ist, große, offene Wunden an den Extremitäten zu heilen. Die vorliegende Erfindung liefert einen großen Beitrag zur modernen Medizin.

Kurze Beschreibung der Zeichnung

Fig. 1 zeigt die Bildung von Blutgefäßen in Wunden, die mit einem Tissue-Faktor exprimierenden Vektor (a) transfiziert worden sind. (b) und (c) zeigen Kontrollen.

Die vorliegende Erfindung wird durch das Beispiel erläutert.

Beispiel: Herstellung eines Tissue-Faktor exprimierenden Plasmids und seine Verwendung zur Förderung von Wundheilung

5 (A) in die BamHI-Stelle der "multiple-cloning site" von pcDNA3 (Invitrogen) wurde die gesamte translatierte Region (1,8 kb) des Maus-Tissue-Faktor-Gens integriert. Damit stand diese Region unter der Kontrolle des CMV-Promotors. Es wurde das Expressionsplasmid pcDNA3-TF erhalten. In gleicher Weise wurde in der EcoRI-Stelle
10 der "multiple-cloning site" von pcDNA3 die kodierende Region (0,7 kb) des Maus-Tissue-Faktor-Gens in "antisense" Richtung integriert. Damit stand diese Region ebenfalls unter der Kontrolle des CMV-Promotors. Es wurde das Expressionsplasmid pcDNA3-TF-AS erhalten. Dieses stellt die Kontrolle (b) dar.

15 (B) Auf den Rücken von drei weiblichen NOD Mäusen (Bomholtgaard, Dänemark) wurden jeweils 6 mm "full thickness" Wunden im Abstand von 8 - 10 mm zueinander gesetzt. Diesen Wunden wurden Mischungen verabreicht, die 2 μ g pcDNA3-TF, pcDNA3-TF-AS (Kontrolle (b)) bzw. pcDNA3 (Kontrolle (c)) und jeweils 12 μ g
20 DOTAP-Transfektionsreagens (Boehringer Mannheim) enthielten. Die Wunden wurden mit Ohmann Opraflex bedeckt.

Zum Nachweis der Bildung von Blutgefäßen in den Wunden wurden 6 bzw. 8 Tage nach Verabreichung der Mischungen jeweils 300 μ l
25 Tinte (Nigrosin, Sigma) in die Schwanzvene der Mäuse injiziert. Danach wurden die Tiere getötet und die Hautpartien mit den Wunden unter dem Mikroskop untersucht.

30 Es zeigte sich, daß bei Verabreichung eines Tissue-Faktor exprimierenden Vektors (a) Blutgefäße in Wunden gebildet und somit Wundheilung gefördert wird.

P 3003

Patentansprüche

- 5 1. Verwendung von Tissue-Faktor zur Förderung von Wundheilung.
2. Verwendung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß es sich um eine gestörte Wundheilung handelt.
- 10 3. Verwendung nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß es sich um die Wundheilung bei Diabetis mellitus, Vaskulitis, arterieller Verschußkrankheit, chronischem venösen und infiziertem Ulcus, Innervationsstörungen, Dekubitus und Nahtschwächen bei Operationen handelt.
- 15 4. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 - 3, dadurch gekennzeichnet, daß der Tissue-Faktor als exprimierbare Nukleinsäure vorliegt.
5. Verwendung nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Expression der Nukleinsäure transient ist.
- 20 6. Verwendung nach Anspruch 4 oder 5, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleinsäure eine DNA ist.
7. Verwendung nach einem der Ansprüche 4 - 6, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleinsäure unter der Kontrolle eines konstitutiven oder induzierbaren Promotors steht.
- 25 8. Verwendung nach einem der Ansprüche 4 - 7, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleinsäure in einem Sindbis-Virus-Replikon-Vektor vorliegt.
- 30 9. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 - 8, dadurch gekennzeichnet, daß der Tissue-Faktor in einem Liposom oder Goldpartikel vorliegt.

- 7 -

10. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 - 9, dadurch gekennzeichnet, daß der Tissue-Faktor in Kombination mit weiteren die Wundheilung fördernden Faktoren vorliegt.

5 11. Verwendung nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß die Faktoren als exprimierbare Nukleinsäuren vorliegen.

12. Verwendung nach Anspruch 10 oder 11, dadurch gekennzeichnet, daß einer der Faktoren VEGF ist.

P 3003

Zusammenfassung

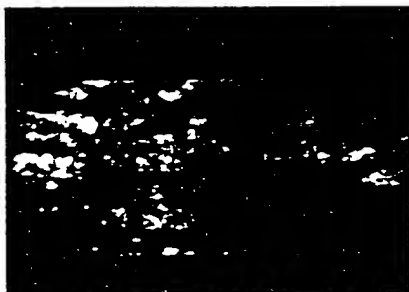
5

Tissue-Faktor zur Förderung von Wundheilung

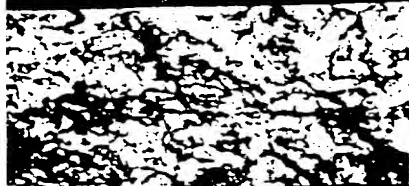
Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung von Tissue-Faktor zur Förderung von Wundheilung.

Fig. 1

(a)



(b)



(c)

